Ueber die Einwirkung

der

proteolytischen Fermente Pepsin und Trypsin

auf Milzbrandbacillen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doctorwürde

in der

Medicin, Chirurgie und Geburtshilfe.

Der medicinischen Facultät in Tübingen

vorgelegt von

Walter Sigwart

approb. Arzt aus Tübingen.

ACAD. LUGDBAT. BIBL.

Tübingen 1900.

Hierzu 8 Abbildungen, Tafel III.

Braunschweig.

Druck von Albert Limbach G. m. b. H.

Gedruckt mit Genehmigung

der medicinischen Facultät der Universität Tübingen.

Referent: Professor Dr. v. Baumgarten.

Meinem Vater

in Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552310_0164

Die Untersuchungen, welche bisher über die Wirkung proteolytischer Fermente auf pathogene Mikroorganismen gemacht wurden, standen zumeist im Zusammenhange mit der Frage der desinficirenden Wirkung des Magensaftes, wobei das Augenmerk mehr auf das Verhalten der Salzsäure, als auf das des Ferments gerichtet war.

Hierher gehört vor Allem die Arbeit von Falk [1], welcher verschiedene Verdauungssäfte auf milzbrandige und tuberkulöse Gewebestückchen einwirken liess und dann dies Material empfänglichen Thieren einimpfte. Er fand eine stark bactericide Wirkung des sauern Magensaftes auf die Milzbrandbacillen, während eine Wirkung auf Tuberkelbacillen ausblieb. Dieselbe Wirkung jedoch erzielte er auch mit der Salzsäure allein. Frank [2] konnte in seiner Arbeit die Mittheilungen Falk's im Wesentlichen bestätigen. Auch die Verdauungsversuche, welche Kabrhel [3] angestellt hat, sind auf die desinficirende Wirkung des Magensaftes und auf das Verhalten der Salzsäure gerichtet, wobei namentlich der Eigenschaft des Eiweisses, im Magen Salzsäure zu verdecken, Rechnung getragen wird.

Erneutes Interesse gewann die Frage durch die Untersuchungen über die bactericiden Eigenschaften des Blutserums, welche von Buchner auf enzymartige Stoffe, die Alexine, bezogen wurden. Es lag nun nahe, bei der Annahme dieser unbekannten Enzyme, das Verhalten der uns bekannten Fermente pathogenen Keimen gegenüber nach dieser Richtung hin zu prüfen. Hier sind nun die Versuche ziemlich vereinzelt geblieben, und auch die Resultate der einzelnen Autoren stimmen nicht überein. Gamaleia [4], welcher schon vor zwölf Jahren derartige Versuche anstellte und dieselben in neuerer Zeit wiederholte, erhielt ganz widersprechende Resultate. Damals fand er, dass Säurepepsin dieselbe bactericide Wirkung auf lebende Anthraxbacillen ausübte, wie das bactericide Serum, aber die Wirkung war keine intensive. Als er aber die Milzbrandbacillen durch Kochen tödtete, hörte jede

Wirkung des Pepsins auf die Bacterien auf. Bei den erneuten Versuchen „zeigte sich, dass peptische Fermente (Trypsin, Pepsin und andere) fähig sind, Bacterien zu verdauen“ [5].

Buchner [6] kann nachtheilige Wirkungen von Enzymen, z. B. Pankreatin, auf Bacterien nicht nachweisen.

Baumgarten [7] hat gelegentlich seiner Untersuchungen über das Immunitätsproblem das mikroskopische Verhalten der Bacterien in richtigen Enzymen untersucht und fand, dass die Bacterien in Trypsin ziemlich stark aufquellen und sehr durchsichtig werden, ohne sich aufzulösen; in Salzsäurepepsin tritt nach längerer Einwirkung eine Art Fragmentation der Bacillenfäden in längere oder kürzere Querstücke auf, die sich dann ebenfalls nicht weiter verändern. Baumgarten findet demnach nicht die geringste Aehnlichkeit zwischen den durch Fermente hervorgerufenen Formveränderungen und denen, welche man an Bacillen beobachtet, welche in Serum gebracht worden sind.

Die Versuche wurden damals nicht weitergeführt: und so veranlasste mich Herr Professor v. Baumgarten, dieselben von Neuem aufzunehmen und systematisch das Verhalten der Fermente Pepsin und Trypsin auf pathogene Mikroorganismen zu untersuchen mit besonderer Berücksichtigung der etwaigen morphologischen Veränderungen derselben.

Die Art und Weise, wie die Versuche angestellt wurden, war folgende:

Auf die Herstellung der Verdauungslösungen aus der Magenschleimhaut bezw. aus dem Pankreas durch Extrahiren mit Glycerin verzichtete ich, um eine Beeinflussung der Bacterien durch das Glycerin zu vermeiden. Ich benutzte Trockenpräparate (Dr. Grübler), von denen ich Lösungen von verschiedener Concentration für die verschiedenen Versuche herstellte, und von deren starker verdauender Wirkung ich mich durch die Verdauungsproben mit Fibrin und gekochtem Eiweiss überzeugt habe.

Der Säuregrad der Pepsinlösungen war ebenfalls verschieden bei den einzelnen Versuchen. Da die Pepsin- und Trypsinlösungen bei Wärmegraden, welche zur sicheren Sterilisirung nöthig sind, ihre verdauende Wirkung den Eiweisskörpern gegenüber verlieren, so musste ich mich damit begnügen, die Lösungen in gut sterilisirten Gefässen mit sterilisirtem, destillirtem Wasser bezw. 1% Sodalösung herzustellen. Um den störenden Einfluss auszuschalten, welcher sich geltend machen konnte durch das Wuchern der mit dem Trockenpräparat in die Lösungen eingeführten Mikroorganismen, verfertigte ich die Lösungen immer unmittelbar vor den Versuchen. Auf diese Weise gelang es mir, mit beinahe vollständig sterilen Lösungen zu arbeiten. Von einer Des-

inficirung der Lösungen durch ein Antisepticum wie Thymol o. a. nahm ich Abstand wegen der dabei zu gewärtigenden Schädigung der Versuchsbacterien.

Zu den Versuchen wurden, um möglichst widerstandsfähige Bacterien zu haben, hochvirulente 24stündige Milzbrandbacillenculturen, sowohl in Bouillon als auf Agar gewachsen, verwendet. Die Bouillonculturen benutzte ich, um die Bacillen nicht ihres Nährbodens zu berauben, da mir daran gelegen war, die Fermentlösungen wirken zu lassen, während die Bacillen sich in möglichst guten Wachsthums- und Ernährungsverhältnissen befanden. Die Agarculturen dagegen verwendete ich in der Weise, dass ich die Milzbrandbacillen in destillirtem Wasser aufschwemmte, um ihnen den Nährstoff zu entziehen. Die Prüfung der Virulenz geschah durch Ueberimpfen auf Mäuse.

Die erste Versuchsreihe wurde nun in folgender Weise angestellt.

In fünf sterile Röhrchen wurden mit steriler Pipette je 0,5 ccm einer gut vertheilten 24stündigen Milzbrandbacillenbouillon gebracht. Sodann wurden mit steriler Pipette je 0,5 ccm der obigen Lösungen in die einzelnen Röhrchen gegossen, nur in das Röhrchen I, das als Controleröhrchen dienen sollte, kam anstatt deren 0,5 ccm Bouillon, um die Milzbrandkeime auf dieselbe Vertheilung zu bringen wie in den anderen Röhrchen.

Röhrchen II wurde beschickt mit 0,5 ccm einer salzsauern Pepsinlösung, welche hergestellt war aus 0,1 trockenem Pepsin, 10 aqua destillata und 0,25 25% HCl. Der Säuregehalt betrug demnach 6,25‰. Durch die Verdünnung mit den 0,5 ccm Milzbrandbacillenbouillon wurde der Säuregrad in dem Röhrchen auf die Hälfte reducirt, also auf 3,125‰. Durch Titriren wurde festgestellt, dass 0,5 ccm alkalischer Bouillon 2,1 mgr HCl neutralisirten, so dass der endgültige Säuregehalt des Röhrchens II annähernd 1‰ betrug.

In Röhrchen III wurden 0,5 ccm derselben Pepsinlösung ohne Salzsäuregehalt gebracht.

In Röhrchen IV Salzsäure von derselben Concentration wie das Säurepepsin.

In Röhrchen V kamen 0,5 ccm einer Trypsinlösung von 0,1 trockenem Trypsin und 10 aqua destillata. Die Alkalescenz der Bouillon war für die Eiweissverdauung hinreichend.

Von diesen Lösungen wurden nun nach $^1/_2$, nach 4, nach 24 Stunden und nach 5 Tagen Agarplatten gegossen mit je einer Oese Flüssigkeit.

Die Röhrchen und Platten wurden während der ganzen Versuchszeit im Thermostaten bei 37,5° C. gehalten.

Das Resultat war folgendes:

Versuch I.

	nach $^1/_2$ St. gegossen	nach 4 St. gegossen	nach 24 St. gegossen	nach 5 Tagen gegossen
I. MBc Bouillon	2500	115	∞	∞
II. MBc Säurepepsin 1 $^0/_{00}$	170	0	2	0
III. MBc Pepsin	2400	1730	3200	∞
IV. Salzsäure 1 $^0/_{00}$	360	184	200	23
V. Trypsin	1280	230	11 000	∞

Aus diesen Zahlen ersieht man, dass die Wachsthumsfähigkeit der Milzbrandbacillen in der Controlebouillon eine uneingeschränkte ist, abgesehen von der starken Herabminderung des Wachsthums nach 4 Stunden, wobei wohl die Möglichkeit mit in Rechnung gezogen werden muss, dass mit der Oese ausnahmsweise wenig Keime auf die Platte gebracht worden sind.

Das Säurepepsin scheint intensiv zu wirken, indem schon nach 4 Stunden keine Colonie mehr anging und auch später nur noch einzelne Colonien auftraten, welche wohl auf Sporenbildung zurückzuführen sind.

Das Pepsin allein übt keine Wirkung aus. Nach 4 Stunden zeigt sich zwar statt einer Vermehrung eine leichte Abnahme, deren Grund zu suchen ist in der Schädigung der Bacillen durch die Wandlung des Mediums (Pepsinzusatz) und die dadurch herbeigeführten assimilatorischen und osmotischen Störungen. Nach 24 Stunden haben die Bacillen sich vollkommen erholt, so dass ihr Wachsthum nach 5 Tagen ins Unendliche geht.

Die Salzsäure in derselben Concentration wie im Säurepepsin, also annähernd 1 $^0/_{00}$, hat entschieden bactericide oder wachsthumshemmende Kraft, da nach 5 Tagen nur noch vereinzelte Colonien angehen. Jedoch ist die Wirkung nicht so intensiv wie die des Säurepepsins, welches schon nach 4 Stunden sämmtliche Bacillen vernichtet hat, so dass der vereinten Einwirkung von Pepsin und Salzsäure der grösste bactericide oder wachsthumshemmende Einfluss zugeschrieben werden muss.

Im alkalischen Trypsin ist nach sehr starker Abnahme nach 4 Stunden, wobei wiederum assimilatorische und osmotische Störungen in Betracht kommen, eine enorme Vermehrung zu beobachten, welche wie bei der Controlebouillon und dem Pepsin nach 5 Tagen ins Unendliche gegangen ist.

Die zweite Reihe von Versuchen, die in gleicher Weise angestellt wurde, ergab im Ganzen dieselben Resultate. Die Platten wurden gegossen nach 1, $3^1/_2$, $7^1/_2$ und 11 Stunden.

Das Resultat war folgendes:

Versuch II.

	nach 1 St.	nach $3^1/_2$ St.	nach $7^1/_2$ St.	nach 11 St.	nach 3 Tagen
I. Bouillon	1300	2450	2450	4300	
II. Säurepepsin 1 ‰	2	0	0	0	0
III. Pepsin	770	2500	5950	4480	∞
IV. Salzsäure 1 ‰	510	1	3	5	7
V. Trypsin	2432	1540	1020	1450	∞

Auch hier hat wiederum das Säurepepsin die stärkste Wirkung ausgeübt, so dass nach einer Stunde beinahe sämmtliche Bacillen getödtet waren, die beiden gewachsenen Keime sind wohl auf resistente Sporen zu beziehen. Nächst dem Säurepepsin ist es die Salzsäure, welche eine stark bactericide Wirkung ausübt, jedoch lange nicht in dem Maasse, wie das Säurepepsin; das Pepsin allein zeigt keine Wirkung, indem die Bacillen sich stetig vermehren, ebenso das Trypsin, bei welchem in den ersten 11 Stunden zwar keine Vermehrung, immerhin aber auch keine nennenswerthe Abnahme der Keime zu bemerken ist. Nach 3 Tagen konnte man aber feststellen, dass die Culturen sowohl in dem Pepsinbouillonröhrchen, als auch in der Trypsinbouillon sich in ganz enormer Weise vermehrt hatten.

Es muss hier allerdings erwähnt werden, dass die verdauende Wirkung des Trypsins feuchtem Fibrin gegenüber nicht so stark war, wie die des Säurepepsins.

Bei der dritten Reihe der Versuche wurde der Säuregrad der Pepsinlösung vermindert und ebenso der der Salzsäure. Die Lösungen waren folgendermaassen zusammengesetzt:

Röhrchen I: Bouillon mit Milzbrandbacillen.

Röhrchen II: Bacillenbouillon mit Säurepepsin, Säuregrad: annähernd 1 ‰.

Röhrchen III: Bacillenbouillon mit Säurepepsin, Säuregrad: annähernd 0,5 ‰.

Röhrchen IV: Bacillenbouillon mit Pepsin.

Röhrchen V: Bacillenbouillon mit Trypsin.

Röhrchen VI: Bacillenbouillon mit 1 ‰ HCl.
Röhrchen VII: Bacillenbouillon mit 0,5 ‰ HCl.
Das Resultat war folgendes:

Versuch III.

	nach. $^1/_2$ St	nach $4^1/_2$ St.	nach 8 St.	nach 24 St.
I. Bouillon	5800	2700	5400	∞
II. Säurepepsin 1 ‰	2	0	0	0
III. Säurepepsin 0,5 ‰	4	0	0	0
IV. Pepsin	1280	2000	5600	∞
V. Trypsin	1730	1900	2200	∞
VI. Salzsäure 1 ‰	550	0	0	0
VII. Salzsäure 0,5 ‰	3400	850	240	700

Auch in dieser Reihe bleibt das Resultat ziemlich constant.

Die stärkere Concentration der Säure wirkt gleichfalls ganz vernichtend, wenn auch langsamer, als das Säurepepsin von gleichem Säuregrade. Das Säurepepsin mit dem halben Säuregrade des stärkeren Säurepepsins hat dieselbe deletäre Wirkung wie das stärkere Säurepepsin. Die Salzsäure allein dagegen, von gleichem Säuregrad wie das schwächer saure Pepsin, ist nur von ganz schwacher Wirkung.

Bei einer vierten Reihe von Versuchen, welche ich mit Bouillonmilzbrandbacillen machte, stellte ich Lösungen her, bei denen ich die Concentration des Pepsins und Trypsins äusserst stark nahm, um zu sehen, ob dies irgend welchen Einfluss auf das Wachsthum der Milzbrandbacillen hätte.

Diese Trypsinlösungen übten eine ebenso stark verdauende Wirkung auf Fibrin aus, wie die Säurepepsinlösungen der vorhergehenden Versuche, wie ich mich durch Verdauungsproben überzeugte. Den Säuregrad des Pepsins dagegen nahm ich so gering, dass er zur Verdauung von Fibrin kaum mehr ausreichte.

Die Lösungen waren folgende:

Röhrchen I: Controlebouillonbacillen.

Röhrchen II: Bacillenbouillon und 0,5 ccm einer Pepsinlösung: 0,2 trockenes Pepsin, 10,0 5 ‰ HCl, so dass im Röhrchen der Säuregrad nach Berücksichtigung der Verdünnung mit Bouillon und der Alkalescenz derselben 0,38 ‰ betrug.

Röhrchen III: Bacillenbouillon und Pepsin 0,5 : 20.
Röhrchen IV: Bacillenbouillon und Trypsin 0,25 : 20.
Röhrchen V: Bacillenbouillon und Trypsin 0,5 : 20.
Röhrchen VI: Bacillenbouillon und HCl 0,38 ‰.
Das Resultat war folgendes:

Versuch IV.

	nach $^1/_2$ St.	nach $3^1/_2$ St.	nach 8 St.	nach 24 St.	nach 3 Tagen
I. Bouillon	4000	5000	2500	∞	
II. Säurepepsin 0,38 ‰	1600	160	100	60	100
III. Pepsin 0,5 : 20	3300	1600	4500	∞	
IV. Trypsin 0,25 : 20	5000	1280	4000	∞	
V. Trypsin 0,5 : 20	2800	800	200	6200	∞
VI. Salzsäure 0,38 ‰	3000	100	50	50	30

Aus den Zahlen der Versuchsreihe ersieht man, dass das Säurepepsin nicht mehr so intensiv wirkt, wie bei einem zu wirksamer Fibrinverdauung erforderlichen Säuregrad. Die Wirkung des Säurepepsins ist jetzt auch nicht mehr stärker, wie die der Salzsäure von gleicher Concentration. Es kann dies so erklärt werden, dass bei den früheren Versuchen die verdauende Kraft des Pepsins, welche bei dem vorliegenden Versuch wegfällt, die durch die Salzsäure geschädigten und lebensschwachen Bacterien vollends tödtete, während die Bacterien, welche in der schwachen Säure allein nicht getödtet, sondern nur geschwächt waren, aus der Salzsäure auf Agar gebracht, sich wieder erholen und zu neuem Wachsthum gelangen konnten.

Die Verdauung lebensschwacher, nicht virulenter sowie todter Bacillen durch die Fermente wird später noch bei anderen Versuchen gezeigt werden.

Das starke Pepsin allein hat keinerlei Einwirkung auf die Milzbrandbacillen, welche nach 24 Stunden ins Unendliche gewachsen sind. Dagegen scheint die starke Concentration des Trypsins die Bacillen in ihrem Wachsthum bedeutend zu stören. Doch haben wir keinen Grund, eine „bactericide“ Wirkung der concentrirten Trypsinlösung anzunehmen, da die Aenderung des Nährbodens und die dadurch herbeigeführte Assimilationsstörung die Keimverluste in den Platten hin-

reichend erklären, und die Bacillen sich, wie wir sehen, bereits nach 24 Stunden zu kräftigem Weiterwachsthum erhoben haben.

Um den Einfluss des bei den bisherigen Versuchen immer vorhandenen Nährstoffes, der die Widerstandskraft und Vitalität der Bacillen bedeutend erhöhen musste, auszuschalten, wurde bei den folgenden Versuchen in der Art verfahren, dass Milzbrandculturen, die in 24 Stunden auf Agar gewachsen waren, in destillirtem Wasser aufgeschwemmt wurden. Im Uebrigen waren die Versuche wie die vorhergehenden angeordnet, nur musste der Säuregrad wegen der wegfallenden Alkalescenz der Bouillon geringer genommen werden.

Zu je 0,5 ccm Milzbrandbacillenwasser kamen demnach

in Röhrchen I 0,5 destillirtes Wasser zur Verdünnung der Aufschwemmung zum Zwecke der Controle,

in Röhrchen II 0,5 ccm Salzsäurepepsin von einem Säuregrad von 1,5 $^0/_{00}$,

in Röhrchen III Pepsin 0,1 : 10,

in Röhrchen IV Trypsin 0,1 : 10 1 $^0/_0$ Sodalösung,

in Röhrchen V Salzsäure 1,5 $^0/_{00}$.

Das Resultat war folgendes:

Versuch V.

	nach $^1/_2$ St.	nach 6 St.	nach 10 St.	nach 24 St.
I. Destill. HOH	5900	6400	4000	2560
II. Säurepepsin 1,5 $^0/_{00}$	0	0	0	0
III. Pepsin 0,1 : 10	300	3840	4480	3850
IV. Trypsin 0,1 : 10	2240	700	75	600
V. Salzsäure 1,5 $^0/_{00}$	1	0	0	0

Nach diesen Zahlen ist demnach, wie nicht anders zu erwarten, bei der Nahrungsentziehung eine langsame Abnahme der Culturen im destillirten Wasser zu sehen. Das Säurepepsin wirkt bei dem hohen Säuregehalt äusserst deletär, ebenso die Säure allein.

Das Pepsin, welchem stets einige Peptone anhängen, scheint als mässiger Nährboden zu dienen.

Im Trypsin zeigen die Bacillen eine Abnahme, und zwar eine bedeutendere als im destillirten Wasser; dies mag darauf zurückzuführen

sein, dass das Trypsin die durch das destillirte Wasser stark geschädigten, aber noch lebenden Bacillen, welche sich ohne Trypsineinwirkung in bessere Nährverhältnisse gebracht, wieder erholen würden, verdaut.

Bei den nächsten Versuchen wurden grösstentheils dieselben Lösungen benutzt wie bei Versuch IV.

Versuch VI.

	nach 5 Minuten	nach 3 St.	nach $7^1/_2$ St.	nach 24 St.	nach 3 Tagen
I. Destillirtes Wasser	1000	2300	3000	6600	900
II. Säurepepsin	448	550	4	6	0
III. Pepsin	2500	5120	3800	∞	
IV. Trypsin 0,25 : 20	4100	2560	150	5580	
V. Trypsin 0,5 : 20	1500	400	700	450	5760
VI. Salzsäure wie II	2100	450	30	3	0

Die Bacillen wurden zu diesem Versuch genommen von einer 24stündigen Agarcultur, welche mit dem Blute einer nach 24 Stunden an Impf-Milzbrand verendeten Maus angelegt war. Aus den Zahlen ersieht man eine grosse Resistenz dieser hochvirulenten, lebenskräftigen Bacterien in destillirtem Wasser. So ist auch die Abnahme in Säure und Säurepepsin eine langsamere. Die starke Concentration des Pepsin mit den ihm anhaftenden Nährstoffen genügt, um diese kräftigen Bacillen sich ins Unendliche vermehren zu lassen. Ebenso scheinen dem stark concentrirten Trypsin hinreichend genug Nährstoffe anzuhängen, um nach einer anfänglichen, wohl dem Hunger hauptsächlich zuzuschreibenden Verminderung eine spätere Vermehrung der Keime zu gestatten. Ob auch diese kräftigen Bacillen im anfänglichen Hungerstadium einer partiellen Verdauung unterliegen, dürfte sich aus den Zahlen kaum entnehmen lassen.

Um nun den Unterschied zu sehen zwischen der Wirkung der Fermente auf diese hochvirulenten Bacillen und derjenigen auf weniger lebenskräftige Bacillen, nahm ich eine alte Agarcultur, die auf Agar weitergeimpft leidlich gut wuchs, welche aber nicht im Stande war, eine Maus zu tödten, und stellte dieselbe Versuchsreihe an.

Das Resultat war folgendes:

Versuch VII.

	nach $^1/_4$ St.	nach 3 St.	nach 8 St.	nach 24 St.	nach 3 Tagen
I. Dest. HOH	3000	900	2450	2400	0
II. Säurepepsin	0	0	0	0	0
III. Trypsin 0,25 : 20	9000	5200	2050	830	0
IV. Trypsin 0,5 : 20	700	30	2	0	0
V. Salzsäure wie II	4	0	0	0	0

Der Unterschied zu den vorhergehenden Resultaten ist ganz evident. Die lebensschwachen Bacillen sind nach 3 Tagen im destillirten Wasser sämmtlich abgestorben; das Säurepepsin und die Salzsäure für sich vernichten sie sofort. Das Trypsin vernichtet in stärkerer Concentration diese von Haus aus schwachen und durch die Einsaat in das destillirte Wasser noch stärker geschwächten Bacillen sehr schnell, und auch das schwächere Trypsin übt eine, wenn auch weit langsamere, vernichtende Wirkung aus, welche noch etwas stärker ist als die des destillirten Wassers.

Dass das negative Resultat bei den mit Säurepepsin und mit Salzsäure behandelten Platten nicht nur auf einer wachsthumshemmenden Wirkung der Säure beruhe, sondern dass die Bacillen wirklich abgetödtet waren, wies ich dadurch nach, dass ich eine Platte mit dem Säurepepsin ausgesetzten Milzbrandbacillen beschickte, sodann die Säurepepsinbacillenbouillon mit 1 % Sodalösung alkalisch machte und nach einer Weile wiederum eine Platte goss. Beide Platten blieben keimfrei, die Bacillen waren also todt, oder wenigstens durch das Säurepepsin derart geschädigt, dass sie auch nach Neutralisirung der Säure in den Platten nicht mehr wuchsen.

Betrachten wir nun, was aus den bisherigen Versuchen gefolgert werden kann, so ergiebt sich etwa Folgendes:

Die Wirkung der Salzsäure allein ist eine beinahe ebenso stark bactericide, wie die des Säurepepsins (vergl. Versuch I, II und III). Die letztere ist etwas stärker, so dass wir annehmen müssen, dass diejenigen Bacterien, die von der Salzsäure allein nicht getödtet, sondern nur geschwächt werden, der combinirten Wirkung des Pepsins und der Säure erliegen. Es ist also der Untergang im Säurepepsin in der Hauptsache keine Ferment-, sondern eine Säurewirkung.

Wird die Säure so schwach genommen, dass sie wohl noch Bacterien schädigt, zur Eiweissverdauung aber nicht mehr ausreicht, so ist die Wirkung der Säure und des Säurepepsins gleich, ja diejenige der Säure eher stärker. (Vergl. Versuch IV.)

Fällt die bactericide Wirkung der Säure weg, wie bei dem Trypsin, während die Eiweiss verdauende Kraft des Ferments die gleiche ist, wie bei dem Säurepepsin, so findet keinerlei wachsthumshemmende, geschweige denn bactericide Wirkung auf die Milzbrandbacillen statt, vorausgesetzt, dass dieselben sich in guten Ernährungs-, Wachsthums- und Virulenzverhältnissen befinden. (Vergl. Versuch I bis IV.)

Es ist nicht die chemische Beschaffenheit des Bacillenleibs, welche der proteolytischen Fermentwirkung widersteht, sondern die den Mikroorganismen innewohnende Lebensenergie. Wird diese stark geschwächt oder erlischt sie ganz, so kann das Ferment seine verdauende Wirkung auf die Bacillen ausüben, sowohl das in saurer Lösung wirkende Pepsin, als auch das in alkalischer Lösung wirkende Trypsin. (Vergl. Versuch VII.) Dies geht auch deutlich hervor aus den mikroskopischen Präparaten, wie wir später sehen werden, indem in den Ausstrichpräparaten, welche mit von der Salzsäure getödteten Bacillen gemacht wurden, die Anzahl der Bacillenleichen nach 24 Stunden dieselbe war, wie in Präparaten, welche nach 3 oder 6 Stunden angefertigt wurden. In den mit Säurepepsin behandelten Präparaten dagegen nahmen die Bacillen von Stunde zu Stunde ab und verschwanden zuletzt beinahe ganz.

Einen weiteren Beleg dafür, dass getödtete Bacillen auch von dem in alkalischer Lösung wirkenden Trypsin verdaut werden, erbrachte ich folgendermaassen: Ich strich die von einer Agarcultur genommenen Milzbrandbacillen auf einen Objectträger aus und liess sie in trockener Wärme eine Woche lang eintrocknen. Die feste Masse wurde sodann abgekratzt, zerkleinert und in alkalisches Trypsin gebracht. Man konnte nun direct beobachten, wie die Hauptmasse sich auflöste und die Flüssigkeit sich wieder klärte, während ein ganz kleiner Rückstand sich Tage lang hielt und sich allmählich wieder zu vermehren begann. Mit diesem Rückstand wurde nun eine Platte gegossen, und es zeigte sich, dass etwa 70 Keime gewachsen waren. Es waren die bei dem Austrocknungsprocess nicht getödteten Bacillen, welche dem Trypsin Trotz boten. Die grosse Masse der Bacillen war todt und wurde verdaut.

Das neutrale Pepsin hat, wie zu erwarten war, auf die Milzbrandbacillen keinerlei bactericide Wirkung. Bei Agarmilzbrandbacillen in destillirtem Wasser wirkt es als mässig guter Nährboden, was wohl den dem Pepsin anhaftenden Eiweisskörpern zuzuschreiben ist.

Um die morphologischen Veränderungen, welche die Bacillen in den Fermentlösungen möglicher Weise erleiden konnten, zu beobachten, wurde zu jeder Platte das entsprechende Ausstrichpräparat angefertigt. Zur Färbung benutzte ich auf Rath des Herrn Professor Baumgarten wässeriges Methylviolett, welches sehr gute Resultate lieferte.

Bei allen Säurepepsinpräparaten ist nun sehr deutlich zu beobachten, dass die Präparate der ersten Stunden noch ebenso viele Bacillen aufweisen, wie die entsprechenden Salzsäurepräparate, während in Präparaten, welche nach 24stündiger Einwirkung angefertigt wurden, die Zahl der Bacillen in den Säurepepsinpräparaten bedeutend geringer ist, als in den Säurepräparaten, so dass man Mühe hat, einige Bacillenfäden zu finden. Es geht daraus, wie schon oben bemerkt, hervor, dass die Bacillen von der Salzsäure getödtet und vom Pepsin verdaut, d. h. aufgelöst werden. (Wenn Gamaleia keine Einwirkung des Säurepepsins auf durch Kochen getödtete Bacillen nachweisen kann, so mag dies darauf beruhen, dass die durch das Kochen coagulirten Bacillen von dem Säurepepsin schwer angegriffen werden.) Bei genauerem Zusehen findet man in den Präparaten viele ganz matte Schatten von Bacillen. (Vergl. Fig. 4.)

Die wenigen noch erhaltenen Bacillenfäden verhalten sich morphologisch verschieden, je nachdem es Bouillonbacillen oder Agarbacillen in destillirtem Wasser sind, und je nach dem Grad der Concentration, sowohl der Säure als auch des Pepsins.

Bei den Präparaten von Versuch III (wenig Pepsin, mässig starke Säure, Bouillonmilzbrandbacillen) sind die wenigen noch vorhandenen Bacillen von normalen Milzbrandbacillen (vergl. Fig. 1) kaum zu unterscheiden. Sie sind gut gefärbt, zeigen mässige Vacuolisirung, schmale Zwischensubstanz, etwas abgerundete Ecken, während die Bacillen aus der entsprechenden Salzsäure die mannigfaltigsten Formen aufweisen: Die Bacillen sind zum Theil stark gequollen, theils ganz schmal. Es finden sich in den Fäden lange Glieder mit breiter Zwischensubstanz neben ganz kurzen Gliedern mit schmaler Zwischensubstanz, so dass die einzelnen Bacillen ganz cubisch erscheinen. Die Bacillen sind theils stark gefärbt, theils schwach, theils homogen, theils gekörnt. (Vergl. Fig. 5.)

Die Bacillen aus Versuch IV (viel Pepsin, schwache Säure, Bouillon) erscheinen zum geringsten Theil normal, zum Theil sind sie schmäler als normal, haben scharfe Kanten, sehr breite Zwischensubstanz, ohne dass die Continuität der Fäden gestört wäre. Bei den meisten Bacillen scheint das Protoplasma sich contrahirt zu haben zu schmalen Stäbchen und Körnchen, während die Zellwand intact bleibt. Man sieht auch in einem Präparat deutlich die nicht gefärbte Membran mit dem schmalen gefärbten Zellinhalt. (Vergl. Fig. 4.)

Die entsprechenden Salzsäurepräparate sind von normalen Milzbrandbacillen kaum zu unterscheiden. Die zu langen Fäden vereinigten Bacillen zeigen scharfe Ecken, wenig Vacuolen, schmale Zwischensubstanz und gute Färbung.

Die stärkere Fragmentation, welche Baumgarten [8] sah, scheint ein Product stärkerer Säure zu sein.

In den Präparaten mit Milzbrandbacillen aus destillirtem Wasser sind die Degenerationsformen viel mannigfaltiger, da hier der Einfluss des destillirten Wassers auf die Bacillen, wie ihn Braem [9] in seiner Arbeit so ausführlich beschrieben hat, sich vorherrschend geltend macht. (Vergl. Fig. 2.) In den Säurepepsinpräparaten sind allerdings diese verschiedenen Formen, wie sie sich im destillirten Wasser finden, verschwunden (verdaut), die wenigen vorhandenen Bacterien sind gut gefärbt und erscheinen nur etwas gequollen. Einige kleine Fäden sind knäuelartig zusammengerollt, eine Erscheinung, wie sie in dem entsprechenden Salzsäurepräparat in viel höherem Maasse auftritt. Dasselbe zeigt neben dem destillirten Wasser die stärksten und mannigfaltigsten Veränderungen der Bacillen (vergl. Fig. 3): Hochgradige Fragmentation, Quellung, Vacuolenbildung, welche bis zu Blasenbildung geht, kaum ein normal aussehender Bacillus ist zu finden, nur Trümmer und Zerstörung.

Es steht dieser Befund im Widerspruch mit den Angaben Dyrmont's [10], welcher an sporenfreien Milzbrandfäden in 5 $^0/_{00}$ Salzsäure nach 24 Stunden weder makroskopisch noch mikroskopisch eine Veränderung wahrnimmt, während bei diesen Versuchen 1,5 bis 2 $^0/_{00}$ Säure schon die starken Veränderungen machen und erst 0,38 bis 0,5 $^0/_{00}$ Salzsäure morphologisch die Bacillen nicht mehr verändert. Dyrmont findet auch, dass 0,5 $^0/_0$ Salzsäure nach 24 Stunden Milzbrandbacillen nicht tödtet, während Kabrhel u. A. die grosse Empfindlichkeit der Bacillen gegen Säure hervorheben und Frank nach mehreren Stunden bei annähernd 3 $^0/_{00}$, Falk sogar bei 1,1 $^0/_{00}$ eine tödtliche Wirkung der Salzsäure auf Milzbrandbacillen constatirten.

Die Bouillonbacillen, auf welche neutrales Pepsin eingewirkt hat, sind, wie zu erwarten war, morphologisch gar nicht verändert und von normalen Milzbrandbacillen nicht zu unterscheiden. In den Pepsinpräparaten mit Bacillen in destillirtem Wasser zeigen sich in den ersten Stunden viele Degenerationsformen, die genau denen entsprechen, welche das destillirte Wasser hervorruft. In den Präparaten, die nach 24 Stunden angefertigt sind, überwiegen bei Weitem die in der Pepsinlösung gewachsenen normalen Bacillen.

In den Trypsinpräparaten zu Versuch III (schwache Trypsinlösung) finden sich die Bacillen nach 24 Stunden äusserst zahlreich, sie haben sich entschieden vermehrt. Alle sind wohl gefärbt, es finden sich ver-

schwindend wenig Degenerationsformen im Vergleich zu der grossen Masse wohlerhaltener Bacillen.

Gegenüber den Bacillen der Controlebouillon erscheinen hier die Bacillen (vergl. Fig. 6) etwas breiter, und besonders auffallend ist die Kürze der einzelnen Glieder des Bacillenfadens, so dass die Bacillen beinahe quadratisch erscheinen, bei manchen geht die Segmentirung noch weiter, so dass die Bacillen breiter als lang erscheinen. (Vergl. oben die Wirkung der Salzsäure.) Es rührt dies mit aller Wahrscheinlichkeit daher, dass das Trypsin wohl im Stande ist, den die Bacillen zu einer Kette vereinigenden todten Bacillenschleim anzugreifen, welcher entweder gelöst oder weniger tingibel wird, als bei normalen Milzbrandfäden, bei denen dann durch die mitgefärbte Zwischensubstanz die einzelnen Glieder viel länger erscheinen.

Aehnliche Bilder erhält man ja auch bei Färbung mit Vesuvin oder Bismarckbraun, welche die Zwischensubstanz nicht färben [11].

Auf derselben Alteration des die Bacillen verbindenden Schleims mag es beruhen, dass die Ketten brüchiger, geknickt erscheinen; sie sind fragmentirt und zeigen nicht mehr die elegant geschwungenen Linien der normalen Milzbrandfäden. Diese Fragmentirung geht bei den dem Trypsin ausgesetzten Agarmilzbrandbacillen, wie wir später sehen werden, noch viel weiter.

In den Präparaten zu Versuch IV (starke Trypsinlösung) kann man deutlich eine Einwirkung des Trypsins auf die Bacillen beobachten, denn entsprechend der anfänglichen Abnahme der Bacillen auf der Platte findet man (vergl. Fig. 7) eine grosse Menge kleiner mehr oder weniger gut gefärbter Bacillentrümmer, welche nur durch ihre Lage noch den Faden, den sie früher bildeten, andeuten. Die meisten der sich gut färbenden Bacillen sind schmäler als die Controlebacillen und haben sich zu Knäueln zusammengeballt, so dass ein solcher Bacillenfaden ein mäanderartiges Bild darbietet. Dass diese Veränderungen hervorgerufen sind durch die Alteration des Nährbodens und nicht durch eine etwaige bactericide Wirkung des Trypsins, zeigt sich deutlich an Präparaten, welche nach 3 Tagen, wo wieder ein starkes Wachsthum auf der Platte zu beobachten war, angefertigt wurden. Dieselben weisen nur ganz normal aussehende Bacillen auf, keine Trümmer sind mehr zu finden, dieselben sind jedenfalls verdaut. Die lebenden, zu Knäueln zusammengeballten Bacillen haben sich ihrem neuen Nährboden angepasst und zu ihrer alten Form zurückgebildet.

Bei den Präparaten mit Milzbrandbacillen in destillirtem Wasser zeigt sich namentlich die Lösung des die Bacillen verbindenden Schleims in noch höherem Maasse als bei den Bouillonmilzbrandbacillen, die Fäden sind in lauter kleine Stücke von nur wenigen bis einzelnen

Bacillen getheilt, so dass man glaubt, man habe ein Präparat von frischem, Milzbrandbacillen haltigem Blute vor sich. (Vergl. Fig. 8.) Daneben finden sich einzelne ganz matt gefärbte Fäden, in denen einzelne Bacillen nur noch angedeutet sind. Diese Degenerationen sind jedenfalls auf die Wirkung des destillirten Wassers zurückzuführen. Je länger die Bacillen dem Trypsin ausgesetzt sind, desto seltener werden diese Degenerationsformen in den Präparaten, ein Zeichen dafür, dass die vom destillirten Wasser stark geschädigten Bacillen von dem Trypsin verdaut wurden.

Vergleichen wir nun die Thatsachen, die wir aus den gefärbten Präparaten entnehmen können, mit den Resultaten, welche die Platten gaben, so geht auch aus den Präparaten mit grosser Deutlichkeit hervor, dass auf die Säure und das destillirte Wasser die stärkste, und zwar primäre Schädigung der Bacillen zurückzuführen ist. Ferner erweist sich die Vermuthung, welche wir aus den Plattenresultaten machen durften, dass die degenerirten und geschädigten Bacillen der proteolytischen Wirkung auch des alkalischen Trypsins unterliegen, als bestätigt, insofern in den Präparaten mit Bacillen, welche den Fermenten länger ausgesetzt waren, die Degenerationsformen, welche reine Säure- und Wasserpräparate aufweisen, allmählich verschwinden.

Wir können uns demnach dahin aussprechen, dass Pepsin und Trypsin nicht im Stande sind, Milzbrandbacillen, welche unter guten Lebensbedingungen stehen, zu verdauen. Wohl aber sind die Fermente fähig, Milzbrandbacillen, welche auf irgend welche Weise sehr stark geschädigt sind, aufzulösen. Todte Bacillen werden wie todtes Eiweiss verdaut.

Alles in Allem haben meine Untersuchungen ergeben, dass die bekannten proteolytischen Fermente, Pepsin und Trypsin, an und für sich, d. h. ohne Mitwirkung freier Säure, keinen bactericiden Einfluss ausüben. Sollten demgegenüber die unbekannten, hypothetischen „Alexine", die Buchner neuerdings mit „proteolytischen Fermenten" vergleicht, eine solche Kraft besitzen, dann wäre es, sobald diese „Alexine" wirklich einmal nachgewiesen werden sollten, an der Zeit, sich für diese „Alexine" nach einem anderen Vergleiche umzusehen, als gerade dem mit den „proteolytischen Fermenten", die, nach obigen Untersuchungen, in alkalischer Lösung (und eine solche ist die Blutflüssigkeit) die Fähigkeit, virulente Bacterien zu tödten, nicht haben.

Zum Schlusse drängt es mich, Herrn Professor Dr. von Baumgarten meinen herzlichsten Dank auszusprechen für die Anregung zu vorliegender Arbeit und für das lebhafte Interesse und die Förderung, welche er meinen Versuchen hat zu Theil werden lassen.

Literaturverzeichniss.

1. Falk, Ueber das Verhalten von Infectionsstoffen im Verdauungscanale: Virchow's Archiv für pathol. Anatomie und Physiologie Bd. XCIII, p. 177.
2. Frank, Ueber das Verhalten von Infectionsstoffen gegenüber den Verdauungssäften: Deutsche medicinische Wochenschrift 1884, p. 309.
3. Kabrhel, Ueber die Einwirkung des künstlichen Magensaftes auf pathogene Mikroorganismen: Archiv für Hygiene Bd. X, 1890.
4. Gamaleia, Elemente der Bacteriologie. Berlin 1900, p. 156.
5. Gamaleia, l. c. p. 161.
6. Buchner, Ueber die nähere Natur der bacterientödtenden Substanz im Blutserum: Centralblatt für Bacteriol. und Parasitenkunde Bd. VI, 1889, p. 565.
7. Baumgarten, Beiträge zur Lehre von der natürlichen Immunität: Arbeiten aus dem pathol.-anatom. Institut zu Tübingen Bd. III, 1899, Heft 1.
8. Baumgarten, l. c. (Ich möchte hierzu bemerken, dass sich meine diesbezüglichen Beobachtungen auf Präparate im Hängetropfen beziehen, während Sigwart Culturglaspräparate direct färbte. Das macht einen Unterschied, indem im ersteren Falle die wirksamen Stoffe nicht bloss [durch Verdunstung] concentrirter, sondern auch aus Gründen der Osmose intensiver auf die Bacterien zur Einwirkung gelangen. Vergl. A. Fischer: Zeitschr. für Hygiene Bd. 35, 1900. Baumgarten.)
9. Braem, Untersuchungen über die Degenerationserscheinungen pathogener Bacterien im destillirten Wasser. Dissertation (unter Baumgarten's Leitung), Königsberg 1888; vergl. auch: Bacteriologische Arbeiten, herausgegeben von P. Baumgarten: E. Ziegler's Beiträge Bd. VII, Heft 1, 1889.
10. Dyrmont, Einige Beobachtungen über die Milzbrandbacillen: Archiv für experim. Pathologie Bd. XXI.
11. Vergl. Baumgarten: Lehrbuch der pathol. Mykologie. p. 429.

Erklärung der Abbildungen.

Figur 1: Milzbrandbacillen, in Bouillon cultivirt, 24 Stunden alt. Controlpräparat.

Figur 2: Milzbrandbacillen, auf Agar cultivirt, nach 60stündigem Aufenthalt in destillirtem Wasser.

Figur 3: Milzbrandbacillen, auf Agar cultivirt, nach 24stündigem Aufenthalt in stark verdünnter Salzsäure.

Figur 4: Milzbrandbacillen, in Bouillon cultivirt, nach 10stündigem Aufenthalt in Salzsäure-Pepsin.

Figur 5: Milzbrandbacillen, in Bouillon cultivirt, nach 24stündigem Aufenthalt in stark verdünnter Salzsäure.

Figur 6: Milzbrandbacillen, in Bouillon cultivirt, nach 24stündigem Aufenthalt in Trypsin.

Figur 7: Milzbrandbacillen, in Bouillon cultivirt, nach 24stündigem Aufenthalt in starkem Trypsin.

Figur 8: Milzbrandbacillen, auf Agar cultivirt, nach 48stündigem Aufenthalt in schwachem Trypsin.

Lebenslauf.

Ich, Heinrich Eberhard Walter Sigwart, bin geboren am 22. Mai 1876 zu Tübingen als Sohn des o. ö. Professors der Philosophie an der Universität Tübingen, Dr. Christoph Sigwart und der verstorbenen Charlotte geb. Georgii. Von Herbst 1884 bis Herbst 1894 besuchte ich das Gymnasium meiner Vaterstadt und widmete mich nach Erlangung des Zeugnisses der Reife dem Studium der Medicin an der Landesuniversität. Nach bestandenem Tentamen physicum und nachdem ich meiner Militärpflicht unter der Waffe genügt hatte, begab ich mich zur Fortsetzung meiner Studien nach Kiel und München. Herbst 1898 nach Tübingen zurückgekehrt, bereitete ich mich auf die medicinische Staatsprüfung vor, welche ich im Juli 1900 bestand. Hierauf beschäftigte ich mich zur Erlangung der Doctorwürde bei Herrn Professor Dr. von Baumgarten mit einer Arbeit über die Einwirkung des Pepsin und Trypsin auf Milzbrandbacillen. Am 1. October 1900 trat ich als einjährig-freiwilliger Arzt im Infanterie-Regiment Kaiser Friedrich, König von Preussen (7. württ.) No. 125 ein.

Stuttgart, den 12. October 1900.

Walter Sigwart,
approb. Arzt.

Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

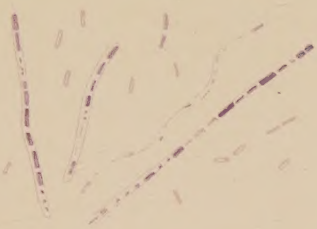

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

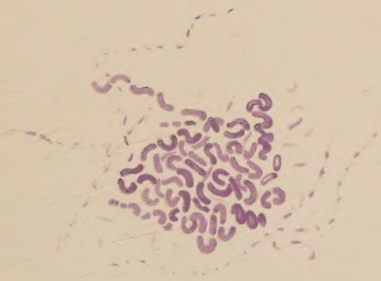

Fig. 8.

W. Sigwart fec.

Verlag von S. Hirzel, Leipzig.

Lith. Anst. Julius Klinkhardt Leipzig